



УДК 547.952 + 599.93 : 577.11

**СТРУКТУРА ОКСИКИСЛОТ И ФИТОСФИНГОЗИНОВ ЦЕРЕБРОЗИДОВ
МОРСКИХ ЗВЕЗД *PATIRIA PECTINIFERA*
И *LYSASTROSOMA ANTHOSTICTA*****Вавер В. А., Шапошникова Г. И., Симонова Т. Н.***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Исследованы фракции цереброзидов морских звезд *P. pectinifera* и *L. anthosticta*. В составе цереброзидов наряду с насыщенными (C_{14} — C_{24}) и моноеновыми (C_{23} — C_{25}) α -оксикислотами и глюкозой были идентифицированы необычные насыщенные C_{18} — C_{19} -фитосфингозины с нормальной и разветвленной углеродной цепью.

О наличии цереброзидов в тканях морских беспозвоночных и особенно о структуре таких цереброзидов известно сравнительно немного. Первым представителем морских беспозвоночных, в котором были обнаружены цереброзиды, является морской анемон *Gyrostoma sp.* [1]. Позднее цереброзиды были найдены в морских звездах *Patiria pectinifera* [2] и *Asterias rubens* [3, 4], а также в губках *Myxilla incrustans* [2] и *Chondrilla nucula* [5].

Недавно в ходе систематического исследования гликолипидов морских беспозвоночных Васьковский с сотр. [6] показали, что цереброзидоподобные вещества (гликолипиды со значениями R_f , близкими к R_f цереброзидов мозга) широко распространены в организмах морских беспозвоночных. Однако детальному структурному исследованию до настоящего времени были подвергнуты лишь цереброзиды морской звезды *A. rubens* [3] и губки *Ch. nucula* [4]. В составе цереброзидов *A. rubens* наряду с насыщенными α -оксикислотами (C_{16} — C_{22}) и глюкозой были идентифицированы необычные C_{18} — C_{22} -моноеновые и диеновые сфингозины [3]. Состав сфингозиновых оснований цереброзидов *Ch. nucula* также был необычным: все выделенные C_{17} — C_{19} -сфингозины оказались аналогами фитосфингозина [5].

Настоящее сообщение представляет собой часть исследований, предпринятых с целью установления строения цереброзидов беспозвоночных Японского моря, и в первую очередь морских звезд. Особое внимание решено было обратить на определение структуры сфингозиновых оснований цереброзидов, так как, судя по приведенным выше литературным данным, именно сфингозиновые основания определяют специфические особенности цереброзидов различных видов морских беспозвоночных. В сообщении приведены результаты установления состава оксикислот и структуры фитосфингозинов морских звезд *P. pectinifera* и *L. anthosticta*.

Фракции цереброзидов выделяли из суммарных липидов морских звезд щелочной деградацией глицеридов и глицерофосфатидов, распределением продуктов реакции между водным метанолом и хлороформом и хроматографией смеси растворимых в хлороформе веществ на силика-

Таблица 1

Идентификация α -оксикислот цереброзидов морских звезд в виде ацетатов метиловых эфиров комбинированным методом ГЖХ-масс-спектрометрии

<i>P. pectinifera</i>				<i>L. anthosticta</i>			
Оксикислоты	Содержание, %	<i>m/e</i>		Оксикислоты	Содержание, %	<i>m/e</i>	
		<i>M</i> - 42	<i>M</i> - 59			<i>M</i> - 42	<i>M</i> - 59
$C_{16}:0$	1,8	286	269	$C_{14}:0$	15,9	258	241
$C_{17}:0$	3,0	300	283	$C_{15}:0$	7,6	272	255
$C_{18}:0$	13,3	314	297	$C_{16}:0$	28,7	286	269
$C_{19}:0$	2,0	328	311	$C_{23}:1$	15,2	—	365
$C_{20}:0$	4,5	342	325	$C_{24}:1$	29,8	—	379
$C_{21}:0$	6,2	356	339	$C_{25}:1$	2,7	—	393
$C_{22}:0$	37,7	370	353				
$C_{23}:0$	22,3	384	367				
$C_{24}:0$	9,3	398	381				

Таблица 2

Структура и состав фитосфингозинов цереброзидов морских звезд
Хромато-масс-спектрометрическая идентификация алифатических спиртов — продуктов деградации фитосфингозинов

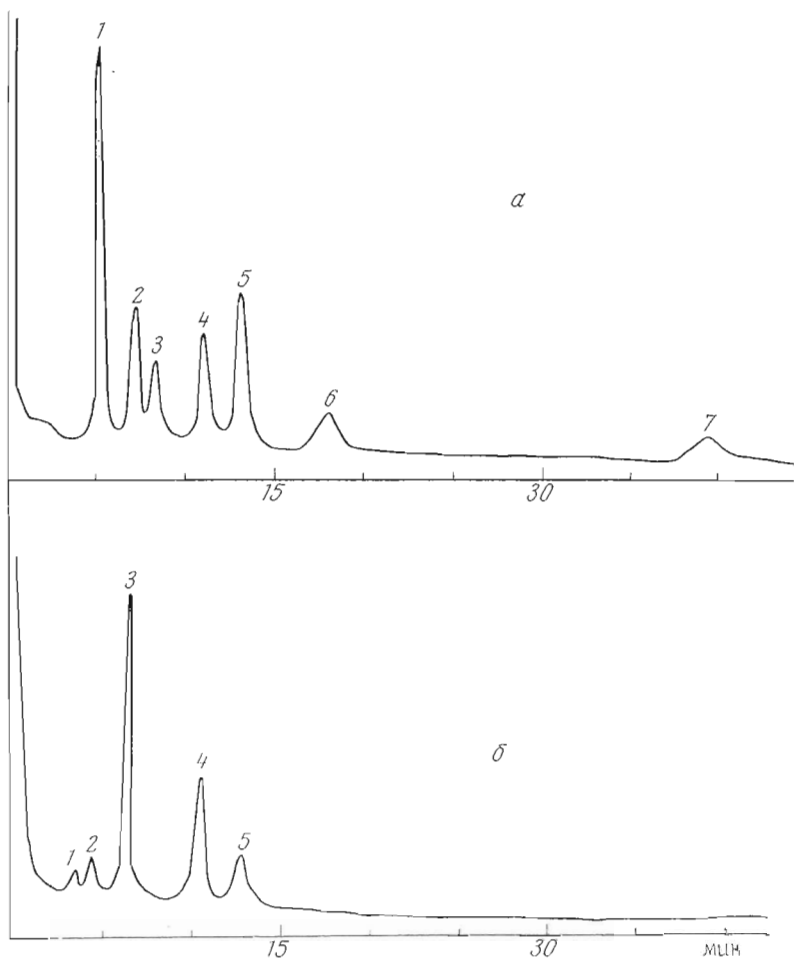
Фитосфингозины	Алифатические спирты						
	Структура	Пики на хроматограмме (рис. 1, а, б)	Характеристические фрагменты, <i>m/e</i>			Содержание, % к сумме	
			<i>M</i> - 18	<i>M</i> - 46	<i>M</i> - 74	<i>L. anthosticta</i>	<i>P. pectinifera</i>
<i>n</i> - $C_{16}:0$	<i>n</i> - $C_{13}:0$	1 (а); 2 (б)	182	154	—	32,0	4,3
<i>изо</i> - $C_{16}:0$	<i>изо</i> - $C_{13}:0$	1 (б)	182	154	126	—	6,4
<i>n</i> - $C_{17}:0$	<i>n</i> - $C_{14}:0$	3 (а)	196	168	—	8,6	—
<i>изо</i> - $C_{17}:0$	<i>изо</i> - $C_{14}:0$	2 (а); 3 (б)	196	168	140	14,2	48,0
<i>n</i> - $C_{18}:0$	<i>n</i> - $C_{15}:0$	5 (а); 5 (б)	210	182	—	20,2	14,5
<i>изо</i> - $C_{18}:0$	<i>изо</i> - $C_{15}:0$	4 (а); 4 (б)	210	182	154	15,2	26,8
<i>изо</i> - $C_{19}:0$	<i>изо</i> - $C_{16}:0$	6 (а)	224	196	168	6,0	—
<i>n</i> - $C_{22}:0$	<i>n</i> - $C_{19}:0$	7 (а)	266	238	—	3,7	—

геле. Полученные таким образом цереброзиды морских звезд при ТСХ на силикагеле давали два пятна, совпадающие по значениям R_f с пятнами цереброзидов мозга крупного рогатого скота и окрашивающиеся антроновым реагентом [7].

В ИК-спектрах цереброзидов морских звезд имелись интенсивные полосы поглощения ассоциированных гидроксильных групп ($3200-3600\text{ см}^{-1}$), полосы поглощения алифатического амида (1655 и 1560 см^{-1}) и $-C-O$ связей (1100 см^{-1}).

Исследование жирнокислотного и углеводного состава цереброзидных фракций морских звезд производилось с использованием кислотного метанолиза [8] (см. «Экспериментальную часть»).

Получающиеся метиловые эфиры оксикислот ацетилювали [9] и анализировали методом ГЖХ и комбинированным методом ГЖХ-масс-спектрометрии. Рассмотрение полученных хроматограмм и масс-спектров показало, что в состав цереброзидов морских звезд входят исключительно $C_{14} - C_{24}$ - α -оксикислоты: в масс-спектрах всех основных компонентов



Газожидкостные хроматограммы спиртов, полученных в результате расщепления фитосфингозинов цереброзидов морских звезд *L. anthosticta* (а) и *P. pectinifera* (б). Условия ГЖХ см. «Экспериментальную часть»

смеси имелись интенсивные пики ионов $[M - (\text{COCH}_3 - 1)]^+$ и характерные для α -оксикислот пики ионов $[M - \text{COOCH}_3]^+$ и отсутствовали пики ионов $[M - \text{CH}_2\text{COOCH}_3]^+$, характерные для β -оксикислот [10] (табл. 1). Фракцию метилгликозидов силилировали [11] и анализировали методом ГЖХ. Результаты анализов показали, что в состав цереброзидов морских звезд входит только один моносахарид — *D*-глюкоза.

Для определения структуры фитосфингозинов нами был использован метод Картера, основанный на окислении цереброзидов иодной кислотой [12]. При такой обработке фитосфингозиновые основания цереброзидов расщепляются по группировке вицинального диола, образуя алифатические альдегиды, состав которых и определяет структурное многообразие фитосфингозинов. В настоящей работе продукты окисления цереброзидов обрабатывали боргидридом натрия, образующиеся из альдегидов первичные спирты выделяли препаративной ТСХ на силикагеле. Спирты и их ацетаты анализировали методом ГЖХ. Сравнение относительных удерживаемых объемов ($V_R^{\text{отн}}$) компонентов природных смесей и $V_R^{\text{отн}}$ нормальных алифатических спиртов (стандартов) позволило, однако, лишь частично идентифицировать спирты, полученные из фитосфингозинов морских звезд (пики 1, 3 и 5 на хроматограмме, изображенной на рис. 1, а, и пики 2 и 5 на хроматограмме рис. 1, б; см. табл. 2). Поскольку порядок

элюирования остальных компонентов анализируемых смесей оставался тем же при хроматографии на колонках как с полярными, так и с неполярными стационарными фазами и не изменялся при гидрировании смесей, было высказано предположение, что остальные спирты, полученные из фитосфингозинов, являются разветвленными.

Для подтверждения этого предположения смеси алифатических спиртов исследовали далее методом ГЖХ-масс-спектрометрии. В полученных масс-спектрах всех компонентов смесей спиртов имелись пики ионов $[M - H_2O]^+$, характерные для первичных алифатических спиртов, и интенсивные пики ионов $[M - H_2O - CH_2CH_2]^+$, а в масс-спектрах компонентов смеси спиртов *L. anthosticta* (рис. 1, а, пики 2, 4 и 6), а также компонентов смеси спиртов *P. pectinifera* (рис. 1, б, пики 3 и 4) имелись еще характерные для изоспиртов пики ионов $[M - (CH_3)_2CH - CH_2OH]^+$ (см. табл. 2).

Найденные из данных ГЖХ и хромато-масс-спектрометрии структуры фитосфингозинов цереброзидов морских звезд приведены в табл. 2.

Результаты настоящей работы показывают, что цереброзиды морских звезд, обитающих в одном и том же районе (залив Посыет Японского моря), могут существенно различаться по составу и содержанию α -оксикислот и фитосфингозинов. Так, основными α -оксикислотами цереброзидов *L. anthosticta* являются $C_{16:0}$ - и $C_{22:1}$ -гомологи, в то время как в цереброзидах *P. pectinifera* преобладают насыщенные α -оксикислоты C_{22} и C_{23} . Основным фитосфингозином цереброзидов *L. anthosticta* является $C_{16:0}$ -гомолог, а цереброзидов *P. pectinifera* — $C_{17:0}$ -фитосфингозин изостроения.

Следует отметить, что разветвленные фитосфингозины в составе цереброзидов морских звезд обнаружены нами впервые.

Экспериментальная часть

В работе были использованы морские звезды *P. pectinifera* и *L. anthosticta*, собранные в бухте «Витязь» (залив Посыет Японского моря) в сентябре 1974 г.

Все растворители очищали по стандартным методикам и перегоняли непосредственно перед употреблением. Для колоночной хроматографии липидов использовали силикагель «Л» (ЧССР, 80—100 меш); для препаративной ТСХ — силикагель КСК (Воскресенского химкомбината, 150—200 меш). Аналитическую ТСХ производили на пластинках размером 6×6 см с силикагелем КСК для микрохроматографии, приготовленным по методике [13]. Пятна липидов обнаруживали 50%-ной серной кислотой в метаноле, 0,2%-ным раствором антрона в смеси метанол — серная кислота (1 : 1) [7] и 0,2%-ным этанольным раствором нингидрида.

ИК-спектры цереброзидов снимали на спектрофотометре UR-10 (Carl Zeiss, Йена, ГДР).

Экстракция липидов. Печень морских звезд *P. pectinifera* и *L. anthosticta* немедленно после извлечения гомогенизировали в размельчителе тканей с 3-кратным (по объему) избытком смеси хлороформ — метанол (1 : 1). Гомогенаты фильтровали, измельченные ткани экстрагировали еще 3 раза 3-кратным объемом смеси хлороформ — метанол (2 : 1) и в заключение хлороформом с таким расчетом, чтобы соотношение хлороформа и метанола в объединенном экстракте составило 2 : 1. К экстракту прибавляли такое количество воды, чтобы соотношение хлороформного и водно-метанольного слоев равнялось 3 : 2. Хлороформный слой отделяли и упаривали в вакууме. Остаток (суммарные липиды) растворяли в абсолютном бензоле и сохраняли на холоду в запаянных ампулах.

Щелочное деацилирование суммарных липидов морских звезд. Выделение фракций цереброзидов. 4 г суммарных липидов, экстрагированных, как описано выше, нагревали в течение 2 ч при 40° со 150 мл 0,1 н. гидро-

окиси калия в 98%-ном метаноле. Продукты реакции нейтрализовали 2,5%-ным раствором хлористого водорода в метаноле до pH 7—7,5, упаривали досуха в вакууме и распределяли в системе хлороформ — метанол — вода (8 : 4 : 3). Водно-метанольный слой отбрасывали, а хлороформный упаривали в вакууме. Остаток (2,8—3,0 г), состоящий из метиловых эфиров жирных кислот, жирных кислот, стеринов и сфинголипидов, хроматографировали на колонке размером 500 × 45 мм с 250 г силикагеля. Метиловые эфиры кислот и свободные жирные кислоты элюировали хлороформом (500 мл), а сфинголипиды — смесями хлороформа и метанола (97,5 : 2,5; 95 : 5; 90 : 10; 85 : 15, по 500 мл). Собирали фракции по 20 мл и анализировали с помощью ТСХ в системе хлороформ — метанол — вода (65 : 25 : 4). Фракции, дающие положительную реакцию с антроном с R_f , равными R_f цереброзидов мозга, объединяли и упаривали в вакууме. Остаток (неочищенные цереброзиды, 180—200 мг) растворяли в 3 мл хлороформа и паносили на 3 пластинки размером 20 × 20 см с 20 г силикагеля КСК, закрепленного 5% гипса. Хроматограммы проявляли в системе хлороформ — метанол — вода (65 : 25 : 4). Зоны с R_f 0,85 и 0,80 вырезали. Вещества элюировали с адсорбента смесь хлороформ — метанол (1 : 1). Элюат упаривали в вакууме. Выход хроматографически однородных цереброзидов 82—99 мг.

Кислотный метанолиз цереброзидов морских звезд. Выделение и анализ метилгликозидов и метиловых эфиров оксикислот. Раствор 10 мг цереброзидов в 2 мл 2,5%-ного раствора хлористого водорода в метаноле кипятили в течение 4—5 ч, контролируя полноту метанолиза методом ТСХ. По окончании реакции метиловые эфиры кислот экстрагировали петролейным эфиром. Метанольный раствор упаривали, остаток 3 раза распределяли в системе хлороформ — метанол — вода (8 : 4 : 3). Водно-метанольный слой, содержащий метилгликозиды, упаривали, остаток стандартизовали 2 мг инозита и силилировали 0,4 мл гексаметилдисилазана и 0,2 мл триметилхлорсилана в 1 мл абс. пиридина (80°, 30 мин). ТМС-эфиры анализировали методом ГЖХ (условия см. ниже). Метиловые эфиры оксикислот, полученные упариванием петролейноэфирного экстракта, ацетилировали раствором уксусного ангидрида в подкисленном хлорной кислотой этилацетате (1 ч, 30°) (методику приготовления ацетилирующего реагента см. [9]). К реакционной смеси прибавляли 0,2 мл абс. метанола и через 30 мин 15—20 мл абс. эфира и 7 г нейтральной окиси алюминия (активность II). Раствор фильтровали, окись алюминия промывали на фильтре еще 20—30 мл абс. эфира. Фильтрат упаривали, ацетаты метиловых эфиров оксикислот анализировали методом ГЖХ и комбинированным методом ГЖХ-масс-спектрометрии.

Газожидкостная хроматография и масс-спектрометрия. Газохроматографический анализ ТМС-эфиров метилгликозидов производили на колонке размером 1500 × 4 мм с 3% силикона SE-30 на силанизированном хромосорбе W (60—80 меш) при 150°. Расход газа-носителя — 50—60 мл/мин, размер пробы — 1 мкл. Прибор — хроматограф фирмы «Rue Unicam», серия 104, модель 64.

Ацетаты метиловых эфиров оксикислот анализировали на колонке 1000 × 4 мм с 3% силикона SE-30 на хромосорбе W (60—80 меш) при программировании температуры со 180 до 270° со скоростью 3°/мин. Прибор — хроматограф фирмы «Rue Unicam», серия 104, модель 64.

Ацетаты алифатических спиртов, полученных окислением фитосфингозинов, анализировали на колонке размером 2000 × 2 мм с 3% силикона SE-30 на хромосорбе W (60—80 меш) при 185° и с 10% полиэтиленгликольсукцината на том же носителе при 180°. Расход газа-носителя — 50—60 мл/мин, размер пробы — 0,5 мкл. Прибор — хроматограф фирмы «Varian-Aerograph», модель 2100.

Хромато-масс-спектрометрический анализ производили на приборе ЛКВ-9000 (фирмы ЛКВ, Швеция). Для хроматографического разделения

метиловых эфиров ацетоксикислот использовали колонку размером 3000×3 мм с 3% SE-30 на хромосорбе W (60—80 меш). Температуру термостата в ходе анализа повышали с 200 до 270° со скоростью 3°/мин. Ацетаты алифатических спиртов разделяли на такой же колонке с 2% полиэтиленгликолядипината на хромосорбе W (60—80 меш) при программировании температуры со 150 до 190°. Температура дозатора и молекулярного сепаратора была равна соответственно в первом случае 250 и 300°, во втором — 200 и 250°. Ионизирующее напряжение — 70 эВ.

Анализ фитосфингозиновых оснований цереброзидов. а) *Окисление цереброзидов.* К раствору 50 мг цереброзидов в смеси 1,5 мл хлороформа и 5 мл 95%-ного этанола прибавляли 3 мл 0,2 М иодной кислоты, реакционную смесь перемешивали до полного растворения цереброзидов и оставляли в темноте на 3 ч при комнатной температуре. Избыток иодной кислоты разрушали 0,1 мл этиленгликоля, к продуктам реакции добавляли 8 мл воды, встряхивали. Хлороформный слой отделяли, водный слой дважды экстрагировали хлороформом. Объединенный хлороформный экстракт промывали водой и упаривали в вакууме.

б) *Восстановление продуктов окисления цереброзидов. Выделение и анализ алифатических спиртов.* К 28 мг суммарных продуктов окисления цереброзидов прибавляли 5,2 мл хлороформа, 22 мл 96%-ного этанола и 8 мл воды; рН раствора доводили до 8,0 прибавлением 1—2 капель 20%-ного водного раствора гидроксида натрия, после чего в течение нескольких минут к нему добавляли раствор 15 мг боргидрида натрия в 4 мл 1 н. гидроксида натрия. Реакционную смесь перемешивали 6 ч при 20°, подкисляли метанольным раствором соляной кислоты, нейтрализовали водным раствором гидроксида натрия. Хлороформный слой отделяли, водный раствор 2 раза экстрагировали хлороформом. Объединенный хлороформный экстракт упаривали, остаток (25—27 мг) снова растворяли в 0,5 мл хлороформа и наносили на одну пластинку размером 20×20 см с 20 г силикагеля КСК (100—150 меш), закрепленного 5% гипса. Хроматограмму проявляли в системе гексан — эфир (1 : 1), зону с R_f 0,5 вырезали, спирты элюировали с силикагеля смесью хлороформ — метанол (1 : 1) (3×20 мл). Объединенный элюат упаривали, остаток (4—5 мг) растворяли в 1 мл хлороформа и разделяли на две половины, одну из которых ацетилировали, как описано выше. Спирты и их ацетаты анализировали методом ГЖХ и комбинированным методом ГЖХ-масс-спектрометрии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rajagopal M. V., Sohnie K. (1957) *Biochem. J.*, **65**, 34—36.
2. Кочетков Н. К., Васьяковский В. Е., Жукова И. Г., Смирнова Г. П., Костецкий Э. Я. (1967) Докл. АН СССР, **173**, 1448—1450.
3. Karlsson K.-A. (1970) *Chem. Phys. Lipids*, **5**, 6—43.
4. Bjorkman L. R., Karlsson K.-A., Pascher J., Samuelsson B. E. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **270**, 260—265.
5. Schmitz F. J., McDonald F. J. (1974) *J. Lipid Res.*, **15**, 158—164.⁴
6. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. I., Svetashev V. I., Zhukova I. G., Smirnova G. P. (1970) *Comp. Biochem. and Physiol.*, **34**, 163—167.
7. Eigberg J. J., Whittaker W. P., Dawson R. M. C. (1964) *Biochem. J.*, **92**, 91—96.
8. Rahm J. J., Holman R. T. (1964) *J. Lipid Res.*, **5**, 169—176.
9. Критчфилд Ф. (1965) Анализ основных функциональных групп в органических соединениях, с. 109—110, «Мир», М.
10. Hanahan D. J., Ekholm J. E., Benson B. (1971) *Biochim. et biophys. acta*, **231**, 343—359.
11. Sweeley C. C., Bentley R., Makita M., Wells W. W. (1963) *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**, 2497—2507.
12. Carter H. E., Rothfus J. A., Gigg R. (1961) *J. Lipid Res.*, **2**, 228—234.
13. Svetashev V. I., Vaskovsky V. E. (1972) *J. Chromatogr.*, **67**, 376—378.

Поступила в редакцию
5.XI.1975

THE STRUCTURE OF HYDROXY ACIDS AND PHYTOSPHINGOSINES
FROM THE CEREBROSIDES ISOLATED FROM SEA STARS
PATIRIA PECTINIFERA AND *LYSASTROSOMA ANTHOSTICTA*

VAVER V. A., SHAPOSHNIKOVA G. I., SIMONOVA T. N.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

A cerebroside mixture was isolated from the sea stars *P. pectinifera* and *L. anthosticta*. The cerebroside were found to contain glucose, the saturated (C₁₄ — C₂₄) and mono-unsaturated (C₂₃ — C₂₅) α -hydroxy fatty acids and a mixture of uncommon straight- and branched-chain trihydroxy C₁₆ — C₁₉ bases.
